

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
24. August 2000 (24.08.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 00/49031 A3

(51) Internationale Patentklassifikation: C07H 21/00,  
C08J 9/20, C08F 20/36, 220/36, C07D 233/48, C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/01028

(22) Internationales Anmeldedatum:  
9. Februar 2000 (09.02.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 07 023.7 19. Februar 1999 (19.02.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];  
D-51368 Leverkusen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PODSZUN, Wolfgang  
[DE/DE]; Roggendorfstrasse 55, D-51061 Köln (DE).  
NEUMANN, Rainer [DE/DE]; Olefstrasse 11, D-50937  
Köln (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,  
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,  
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasis-  
ches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 12. April 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

WO 00/49031 A3

(54) Title: METHOD FOR ISOLATING NUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON NUCLEINSÄUREN

(57) Abstract: Nucleic acids can be efficiently adsorbed on specific water-insoluble pearl polymers with an average size of 3 to 100  $\mu\text{m}$ , at a neutral or acidic pH value. The acids can then be liberated at an alkaline pH with high yields.

(57) Zusammenfassung: Nucleinsäuren können bei neutralem und saurem pH-Wert an speziellen wasserunlöslichen Peripolymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100  $\mu\text{m}$  effizient adsorbiert werden und bei basischen pH-Werten in hoher Ausbeute wieder freigesetzt werden.

**PCT**  
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
 Internationales Büro  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> : <b>C07H 21/00</b></p>	<b>A2</b>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/49031</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 24. August 2000 (24.08.00)</p>		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none; padding: 5px;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/01028</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 9. Februar 2000 (09.02.00)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 199 07 023.7 19. Februar 1999 (19.02.99) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PODSZUN, Wolfgang [DE/DE]; Roggendorfstrasse 55, D-51061 Köln (DE). NEUMANN, Rainer [DE/DE]; Oiefstrasse 11, D-50937 Köln (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none; padding: 5px;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/01028</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 9. Februar 2000 (09.02.00)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 199 07 023.7 19. Februar 1999 (19.02.99) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PODSZUN, Wolfgang [DE/DE]; Roggendorfstrasse 55, D-51061 Köln (DE). NEUMANN, Rainer [DE/DE]; Oiefstrasse 11, D-50937 Köln (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/01028</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 9. Februar 2000 (09.02.00)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 199 07 023.7 19. Februar 1999 (19.02.99) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PODSZUN, Wolfgang [DE/DE]; Roggendorfstrasse 55, D-51061 Köln (DE). NEUMANN, Rainer [DE/DE]; Oiefstrasse 11, D-50937 Köln (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>			
<p>(54) Title: METHOD FOR ISOLATING NUCLEIC ACIDS</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON NUCLEINSÄUREN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Nucleic acids can be efficiently adsorbed on specific water-insoluble pearl polymers with an average size of 3 to 100 <math>\mu</math>m, at a neutral or acidic pH value. The acids can then be liberated at an alkaline pH with high yields.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Nucleinsäuren können bei neutralem und saurem pH-Wert an speziellen wasserunlöslichen Perlpolymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 <math>\mu</math>m effizient adsorbiert werden und bei basischen pH-Werten in hoher Ausbeute wieder freigesetzt werden.</p>				

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

### Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Abtrennen und selektiven Freisetzen von Nucleinsäuren unter Verwendung spezieller Perlpolymerisate.

In jüngster Zeit gewinnt die sogenannte Gen-Diagnostik zunehmend an Bedeutung. Die Gen-Diagnostik hat Eingang gefunden in die Diagnostik humaner Erkrankungen (u.a. Nachweis von Infektionserregern, Nachweis von Mutationen des Genoms, Analyse von zirkulierenden Tumorzellen und Identifizierung von Risikofaktoren für die Prädisposition einer Erkrankung). Aber auch in der Veterinärmedizin, der Umweltanalytik und Nahrungsmitteltestung findet die Gen-Diagnostik mittlerweile ihre Anwendung. Ein weiteres Anwendungsgebiet stellen Untersuchungen an Pathologischen-/Zytologischen Instituten oder im Rahmen forensischer Fragestellungen dar. Aber auch im Rahmen der Qualitäts- und Prozesskontrolle (beispielsweise Untersuchungen von Blutproben auf Infektionserreger-Freiheit) wird die Gen-Diagnostik mittlerweile eingesetzt und der Gesetzgeber plant, die Zahl der heute schon vorgeschriebenen Tests per Gesetz in Zukunft zu erweitern.

Methoden, die bei der Gen-Diagnostik zum Einsatz kommen (wie z.B. Hybridisierungs- oder Amplifikationstechniken wie die PCR, bDNA oder NASBA, TMA Technologie) gehören auch bei wissenschaftlichen Grundlagenarbeiten zu den Routineverfahren.

Durch die zunehmende Verbreitung nicht-radioaktiver Detektionsverfahren, die auch im Rahmen der Gen-Diagnostik eine Rolle spielen, ist zu erwarten, daß die Gen-Diagnostik in Zukunft noch weitere Verbreitung als zur Zeit finden wird.

Bei der Gen-Diagnostik ist die Gewinnung von Gen-Proben aus biologischem Material wie Zellen, Blut, Sputum, Liquor, Serum oder Urin ein wichtiger Teilschritt.

Die Bindung von Nucleinsäuren an polyquaternäre kationische Polymere ist aus der US-A-4 046 750 bekannt. Allerdings ist die Bindung irreversibel, so daß bei dieser Methode die adsorbierten Nucleinsäuren nicht wieder freigesetzt werden können.

- 5 Die US-A-4 055 469 offenbart eine Methode zur Reinigung von Enzymen, wobei Nucleinsäuren und unerwünschte Proteine mit Hilfe wasserlöslicher kationischer Polymere ausgefällt werden. P

- 10 Aus der US-A-4 839 231 sind mit Vinylpyridinpolymer beschichtete Träger bekannt, die Proteine und Nucleinsäuren adsorbieren können. Allerdings ist die Kapazität der Träger recht niedrig und die Adsorption der Nucleinsäuren nicht quantitativ.

- 15 Die WO-A-91/05606 beschreibt ein silanisiertes, poröses Trägermaterial mit Hydroxyalkylaminogruppen für die chromatographische Trennung von Nucleinsäuren. Dieses Material ist jedoch zum schnellen und möglichst quantitativen Abtrennen von Nucleinsäuren aus biologischem Material weniger gut geeignet.

- 20 In der DE-A-4 139 664 wird eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren mit Hilfe von Anionenaustauschern beschrieben. Nachteilig bei diesem Verfahren ist, daß die Desorption der Nucleinsäuren vom Anionenaustauscher nur mit Pufferlösungen hoher Ionenstärke gelingt und die Abtrennung der Salze aus der Pufferlösung zusätzliche Präparationsschritte erfordert.

- 25 Die DE-A-4 333 805 beansprucht die Extraktion von Nucleinsäuren aus einer Probe mit Hilfe von wasserlöslichen Trägern wie Dextran, Acrylamid oder Carboxymethylcellulose und weiteren Reagenzien, wobei die Nucleinsäuren ausgefällt werden.

- 30 In der EP-A-0 707 077 (entspricht der US-A-5 582 988) wird eine Methode zur Isolierung von Nucleinsäuren aus biologischem Material unter Verwendung von löslichem, schwach basischem Polymer beschrieben. Bei dieser Methode wird in einem sauren pH-Bereich ein Fällungsprodukt aus dem löslichen, schwach basischen

Polymer und der Nucleinsäure erzeugt, das Fällungsprodukt von den nicht gefällten Bestandteilen des biologischen Materials abgetrennt und gewaschen und die Nucleinsäure aus dem Fällungsprodukt durch Einstellung eines basischen pH-Wertes wieder freigesetzt.

5

Ein Nachteil der Methoden nach DE-A-4 333 805 und EP-A-0 707 077 besteht darin, daß die Handhabung, insbesondere die Abtrennung und Reinigung des Fällungsproduktes schwierig und sehr zeitaufwendig ist. Diese Methoden lassen sich auch nicht bzw. nur unter erschwerten Bedingungen mit Hilfe automatisierter Analysegeräte ausführen.

10

Die WO-A-96/18731 beschreibt eine Methode zur Isolierung von Nucleinsäuren mit Hilfe eines Detergenz und eines festen Trägers. Da feste Träger ohne Poren und ohne Quellbarkeit eingesetzt werden, ist die Bindungskapazität der Träger relativ gering.

15

In der WO-A-97/08547 wird eine Methode zur Isolierung von Nucleinsäuren beschrieben, bei der die Nucleinsäuren an einem festen hydrophilen organischen Polymer ohne effektive positive Ladung, beispielsweise an Cellulose, gebunden werden. Bei dieser Methode erfolgt die Bindung über schwache Kräfte, wie Van der Waals Wechselwirkungen.

20

Die WO-A-97/34909 beschreibt eine Methode zur Isolierung von Nucleinsäuren unter Verwendung eines speziellen teilchenförmigen Polymerisates mit einer unteren kritischen Löslichkeitstemperatur (lower critical solubility temperature, LCST) von 25-45 °C. Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, daß zur Freisetzung der Nucleinsäuren Puffer mit hohen Ionenstärken, die bei der weiteren Verwendung der Nucleinsäuren stören können, angewendet werden müssen. Wegen der geringen Größe der verwendeten Partikel von 0,05 bis 2 µm ist zudem die Verarbeitung zeitaufwendig und schwierig zu automatisieren.

25

30

Trotz der zahlreichen vorbeschriebenen Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren besteht noch immer ein dringender Bedarf für eine einfache, möglichst automatisierbare Methode zur effektiven Abtrennung und Wiederfreisetzung von Nucleinsäuren aus biologischem Material.

5

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß bestimmte in Wasser unlösliche Perlpolymerisate polymerisierter Einheiten von Aminomonomer, Vernetzer und Vinylmonomer in hervorragender Weise zur Isolierung von Nucleinsäuren geeignet sind.

10

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, umfassend die nachfolgenden Schritte

15 A) Vermischen der Probe mit einem wasserunlöslichen, im basischen und neutralen Bereich nicht ionischen Polymerisat bei einem pH-Wert von 7 oder weniger, wobei die Nucleinsäuren adsorbiert werden,

B) Abtrennen des wasserunlöslichen Polymerisates und

20 C) Vermischen des wasserunlöslichen Polymerisates mit einer wäßrigen Phase mit einem pH-Wert von größer 7, wobei die adsorbierten Nucleinsäuren freigesetzt werden,

dadurch gekennzeichnet, daß das wasserunlösliche Polymerisat ein Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm ist und aus polymerisierten Einheiten von

- 25 a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer  
b) 0,3 bis 30 Gew.-% Vernetzer und  
30 c) 0 bis 93 Gew.-% Vinylmonomer

besteht.

Gegebenenfalls erfolgt in einem Zwischenschritt nach Verfahrensschritt A) die Lyse des biologischen Materials.

5

Bevorzugt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, umfassend die Schritte

10 A) Vermischen der Probe mit einem wasserunlöslichen, im basischen und neutralen Bereich nicht ionischen Polymerisat bei einem pH-Wert von 7 oder weniger, wobei die Nucleinsäuren adsorbiert werden,

B) Abtrennen des wasserunlöslichen Polymerisates und

15 C) Vermischen des wasserunlöslichen Polymerisates mit einer wäßrigen Phase mit einem pH-Wert von größer 7, wobei die adsorbierten Nucleinsäuren freigesetzt werden,

20 dadurch gekennzeichnet, daß das wasserunlösliche Polymerisat ein Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis 500 m<sup>2</sup>/g ist und aus polymerisierten Einheiten von

- 25 a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer  
b) 0,3 bis 30 Gew.-% Vernetzer und  
c1) 0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

besteht, oder daß das wasserunlösliche Polymerisat aus

30 in Wasser gut quellbarem Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm, das aus polymerisierten Einheiten von



- a) 5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer
- b) 0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und
- c2) 10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer

5 besteht.

Insbesondere bevorzugt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, umfassend die oben definierten Schritte A), B) und C), dadurch gekennzeichnet, daß das wasserunlösliche Polymerisat ein  
10 makroporöses Perlpolymerisat mit einer Teilchengröße von 3 bis 100 µm ist, einen Porendurchmesser im Bereich von 10 bis 1 000 nm aufweist, die spezifische Oberfläche bestimmt nach BET 5 bis 500 m<sup>2</sup>/g (ganz besonders bevorzugt 20 bis 200 m<sup>2</sup>/g) aufweist und aus polymerisierten Einheiten von

- 15 a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer
- b) 2 bis 30 Gew.-% Vernetzer
- c1) 0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

besteht, oder daß das wasserunlösliche Polymerisat aus

20

in Wasser gut quellbarem Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm, das aus polymerisierten Einheiten aus

- 25 a) 5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer
- b) 0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und
- c2) 10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer

besteht.

30 Das erfindungsgemäße Verfahren ist zur Isolierung und/oder Reinigung von Nucleinsäuren unterschiedlicher Herkunft, beispielsweise aus Zellen, Gewebematerialien, Blut oder Infektionserregern geeignet. Vor der Isolierung der Nucleinsäuren wird das

zu untersuchende Material durch an sich bekannte Techniken, wie z.B. Aufschluß durch Proteaseverdau aufgeschlossen, wobei eine für die weiteren Schritte A bis C geeignete Probe, ein Lysat, erhalten wird. Gegebenenfalls erfolgt in einem Zwischenschritt nach Verfahrensschritt A) die Lyse des biologischen Materials.

5 Weitere geeignete Aufschlußverfahren sind in DE-A-4 333 805 beschrieben worden.

Es erfolgt das Vermischen der Probe mit einem wasserunlöslichen Polymerisat bei einem pH-Wert von 7 oder weniger, vorzugsweise im Bereich von 2 - 6, besonders bevorzugt im Bereich von 2 - 3 bei Raumtemperatur. Das Abtrennen des wasserun-

10 löslichen Polymerisates erfolgt durch z.B. Filtration oder Zentrifugation. Der so gewonnene Komplex aus Nucleinsäure und Polymerisat kann nun durch Waschen mit geeigneten Puffern wie z.B. TE gereinigt werden.

Zur Freisetzung der gebundenen Nucleinsäuren aus dem Komplex erfolgt nun die

15 pH-Einstellung des Komplexes auf pH-Werte oberhalb von 7, vorzugsweise von 8 - 14, besonders bevorzugt im Bereich 12 - 14.

Die erfindungsgemäßen Perlpolymerisate liefern höhere Adsorptions- und Wiederfreisetzungsraten als die löslichen Polymerisate gemäß EP-A-0 707 077. Die

20 Isolierung läßt sich leichter, d.h. mit weniger Arbeitsschritten und in kürzeren Zeiten durchführen. Die Reinheit der isolierten Nucleinsäuren ist höher, insbesondere erhalten sie weniger inhibierende Nebenprodukte, so daß eine Verstärkung der Nucleinsäuren, beispielsweise durch die sogenannte "PCR-Reaktion" und die "RT-PCR" besonders gut gelingt. Auch in Bezug auf Verdau der gewonnenen

25 Nucleinsäuren mittels Restriktionsenzymen ist das erfindungsgemäße Verfahren der in der EP-A-0 707 077 beschriebenen Methode überlegen.

Weiterhin Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind die makroporösen Perlpolymerisate, dadurch gekennzeichnet, daß diese eine mittlere Teilchengröße von 3 bis

30 100 µm, einen Porendurchmesser von 10 bis 1 000 nm und eine spezifische Ober-

fläche gemessen nach BET von 5 bis 500 m<sup>2</sup>/g aufweisen und aus polymerisierten Einheiten von

- 5      a)      5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer  
      b)      2 bis 30 Gew.-% Vernetzer und  
      c1)     0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

bestehen, sowie

- 10     die in Wasser unlöslichen aber quellbaren Perlpolymerisate, dadurch gekennzeichnet, daß diese eine mittlere Teilchengröße von 3 bis 100 µm aufweisen und aus polymerisierten Einheiten von

- 15      a)      5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer  
      b)      0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und  
      c1)     10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer

bestehen.

- 20     Weiterhin Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung wasserunlöslicher, makroporöser Perlpolymerisate mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm, einem Porendurchmesser von 10 bis 1000 nm und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis 500 m<sup>2</sup>/g dadurch gekennzeichnet, daß man eine Mischung von

25

- a)      5 bis 98 Gew.-Teilen Aminomonomer  
      b)      2 bis 30 Gew.-Teilen Vernetzer  
      c1)     0 bis 93 Gew.-Teilen hydrophobem Vinylmonomer  
      d)      10 - 150 Gew.-Teilen Porogen und  
30     e)      0,1 - 2,5 Gew.-Teilen Radikalbildner

in einem wäßrigem Medium unter Verwendung eines Schutzkolloides dispergiert, anschließend die erhaltene Dispersion durch Erhitzen auf die Zerfallstemperatur des Radikalbildners polymerisiert und nach erfolgter Polymerisation das Porogen durch Extraktion und/oder Abdampfen entfernt,

5

sowie ein Verfahren zur Herstellung von in Wasser unlöslichen aber quellbaren Perl-polymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Mischung von

- 10     a)     5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer  
       b)     0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und  
       c2)    10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer  
       d)     10-150 Gew-Teilen Lösungsmittel und  
       e)     0,1 - 2,5 Gew-Teilen Radikalbildner

15

in einem wäßrigem Medium unter Verwendung eines Schutzkolloides dispergiert, anschließend die erhaltene Dispersion durch Erhitzen auf die Zerfallstemperatur des Radikalbildners polymerisiert und nach erfolgter Polymerisation das Lösungsmittel durch Extraktion und/oder Abdampfen entfernt.

20

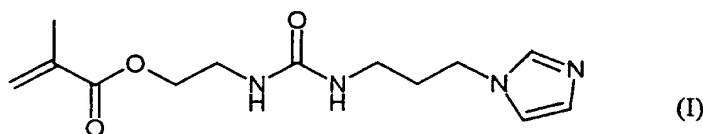
Aminomonomere (a) im Sinne der Erfindung sind polymerisierbare, ethylenisch ungesättigte Verbindungen mit mindestens einer primären, sekundären oder tertiären Aminogruppe. Die sekundäre oder tertiäre Aminogruppe kann dabei auch Teil eines cycloaliphatischen oder aromatischen Ringes sein. Beispielhaft seien genannt N-Vinylimidazol, N-Vinylbenzimidazol, 2-Vinylpyridin und 4-Vinylpyridin. Gut geeignete Aminomonomere sind auch die Derivate der Acrylsäure und Methacrylsäure, wie beispielsweise 2-Aminoethylmethacrylat, N,N-Dimethylaminoethylmethacrylat, N,N-Dimethylaminopropylmethacrylat, N,N-Dimethylaminoethylacrylat, N-tert.-Butylaminopropylmethacrylat, N-(3-Aminopropyl)methacrylamid, N-(3-Imidazolylpropyl)methacrylamid, N-(2-Imidazolethyl)methacrylamid, N-(3-Aminopropyl)-acrylamid, N-(3-Imidazolylpropyl)acrylamid, N-(2-Imidazolethyl)acrylamid, N-(1,1-

25

30

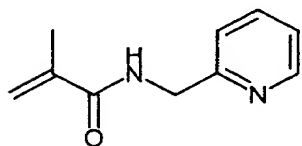
Dimethyl-3-imidazolylpropyl)methacrylamid, N-(1,1-Dimethyl-3-imidazolylpropyl)-acrylamid, N-(3-Benzimidazolylpropyl)methacrylamid und (3-Benzimidazolylpropyl)-acrylamid.

- 5 Gut geeignete Aminomonomere sind auch die Umsetzungsprodukte von Isocyanatoethyl(meth)acrylat und Imidazolylalkylaminen, wie beispielsweise das im Rahmen der vorliegenden Erfindung neue Aminomonomer gemäß Formel (I)

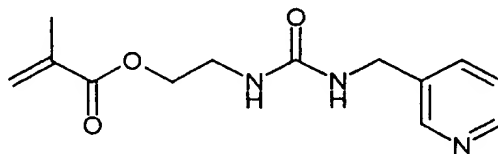


10

Weitere geeignete Aminomonomere gemäß der vorliegenden Erfindung sind die Pyridinderivate der Formeln (II) und (III)



(II)



(III).

15

Auch Derivate von Styrol und  $\alpha$ -Methylstyrol mit Aminogruppen sind gut geeignet. Beispielhaft seien genannt: 4-N,N-Dimethylaminostyrol, 2-N,N-Dimethylaminostyrol, 4-N,N-Diethylaminostyrol und 4-N,N-Bis(2-hydroethyl)aminostyrol.

20

Gemäß der vorliegenden Erfindung geeignete Vernetzer (b) sind: Ethylenglycoldimethacrylat, Butandioldimethacrylat, Hexandioldimethacrylat, Pentaerytritoldimethacrylat, 1,2-Glycerindimethacrylat, 1,3-Glycerindimethacrylat, Triethylenglycoldimethacrylat, Tetraethylenglycoldimethacrylat, Trimethylolpropantrimethacrylat, Pentaerytritotrimethacrylat, Pentaerytritoltetramethacrylat, Ethylenglycoldiacrylat, Butandioldiacrylat, Pentaerytritoldiacrylat, 1,3-Glycerindiacrylat, Triethylenglycol-

25

diacrylat, Trimethylolpropantriacyrat, Pentaerytritoltriacyrat, Pentaerytritoltetraacyrat, Allylmethacrylat, Allylacrylat, Methylen-N,N'-bisacrylamid, p-Divinylbenzol und m-Divinylbenzol.

- 5 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete hydrophobe Vinylmonomere (c1), die in dem erfindungsgemäßen Perlpolymerisat enthalten sein können, sind Acrylsäure-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alkylester, Methacrylsäure-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alkylester, wie beispielsweise Methylmethacrylat oder Butylacrylat, Acrylnitril, Methacrylnitril, Vinylchlorid, Vinylidenchlorid, Vinylacetat und aromatische Vinylmonomere, wie z.B. Styrol,  
10 Vinylnaphthalin, Vinyltoluol, Ethylstyrol,  $\alpha$ -Methylstyrol, Chlorstyrol und Vinylbenzylchlorid.

- Im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete hydrophile Vinylmonomere (c2) sind beispielsweise: 2-Hydroxyethylmethacrylat, 2-Hydroxypropylmethacrylat, 2-  
15 Hydroxyethylacrylat, 2-Hydroxypropylacrylat, Triethylenglycolmonomethacrylat, Tetraethylenglycolmonomethacrylat, Acrylamid, Methacrylamid und N,N-Dimethylacrylamid.

- Für das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von wasserunlöslichen makroporösen Perlpolymerisaten werden Porogene eingesetzt. Hierfür sind flüssige mit  
20 Wasser nicht mischbare Verbindungen, die die eingesetzten Monomere lösen und das gebildete Polymer ausfällen, geeignet. Beispielhaft seien genannt aliphatische Kohlenwasserstoffe, wie Hexan, Heptan, Octan, Isooctan, Isododekan und Alkohole wie Octanol. Das Porogen wird in Mengen von 10 bis 150 Gew.-%, vorzugsweise von 20  
25 bis 100 Gew.% bezogen auf die Summe der eingesetzten Monomere und Vernetzer eingesetzt.

- Geeignete Radikalbildner im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind vorzugsweise öllösliche Initiatoren. Beispielhaft seien genannt: Peroxyverbindungen wie Dibenzoylperoxid, Dilaurylperoxid, Bis (p-chlorbenzoylperoxid), Dicyclohexylperoxydi-  
30 carbonat, tert.-Butylperoctoat, 2,5-Bis(2-ethylhexanoylperoxy)-2,5-dimethylhexan

und tert.-Amylperoxy-2-ethylhexan, desweiteren Azoverbindungen wie 2,2'-Azobis(isobutyronitril), 2,2'-Azobis(2,4-dimethylvalereonitril) und 2,2'-Azobis(2-methylisobutyronitril). Die Initiatoren werden im allgemeinen in Mengen von 0,05 bis 2,5 Gew.-%, vorzugsweise 0,2 bis 1,5 Gew.% bezogen auf die Monomermischung angewendet.

Bei der Herstellung der erfindungsgemäßen gelförmigen und makroporösen Perlpolymerisate werden gegebenenfalls Schutzkolloide in der wäßrigen Phase eingesetzt. Geeignete Schutzkolloide gemäß der vorliegenden Erfindung sind natürliche und synthetische wasserlösliche Polymere, wie beispielsweise Gelatine, Stärke, Cellulosederivate, insbesondere Celluloseester und Celluloseether, Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylsäure, Polymethacrylsäure und Copolymerisate aus Acrylsäure, Methacrylsäure, Methacrylsäureestern und/oder Acrylsäureestern. Besonders gut geeignet sind mit Alkalihydroxid neutralisierte Copolymerisate aus Methacrylsäure und Methacrylsäureester. Die Einsatzmenge der Schutzkolloide beträgt im allgemeinen 0.05 bis 2 % bezogen auf die wäßrige Phase, vorzugsweise 0.1 bis 1 %.

Die wäßrige Phase kann darüberhinaus gegebenenfalls ein Puffersystem enthalten. Bevorzugt werden Puffersysteme, die den pH-Wert der wäßrigen Phase bei Beginn der Polymerisation auf einen Wert zwischen 12 und 5, vorzugsweise zwischen 10 und 6 einstellen. Unter diesen Bedingungen liegen Dispergiermittel mit Carbonsäuregruppen ganz oder teilweise als Salze vor. Auf diese Weise wird die Wirkung der Schutzkolloide günstig beeinflusst. Besonders gut geeignete Puffersysteme enthalten Phosphat- oder Boratsalze.

Die Menge der Wasserphase beträgt im allgemeinen 75 bis 1200 Gew.-%, vorzugsweise 100 bis 500 Gew.-% bezogen auf die Summe aus Monomeren, Vernetzer und Porogen.

Die Rührgeschwindigkeit bei der Polymerisation ist wichtig für die Einstellung der Teilchengröße. Beim erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren nimmt die Größe der erhaltenen Perlpolymerisate mit zunehmender Rührerdrehzahl ab. Die exakte Rührdrehzahl zur Einstellung einer bestimmten vorgegebenen Perlgröße hängt im  
5 Einzelfall stark von der Reaktorgröße, der Reaktorgeometrie und der Rührergeometrie ab. Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, die notwendige Rührdrehzahl experimentell zu ermitteln. Für Laborreaktoren mit 3-Liter-Reaktionsvolumen, die mit Blattrühren ausgestattet sind, werden bei Verwendung von Copolymerisaten aus Acrylsäure, Methacrylsäure, Acrylsäureestern und/oder Methacrylsäureestern als  
10 Dispergiermittel im allgemeinen Perlgrößen von 6 bis 30  $\mu\text{m}$  bei Drehzahlen von 300 bis 500 Upm erreicht.

Die Polymerisationstemperatur des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens richtet sich nach der Zerfallstemperatur des eingesetzten Initiators. Sie liegt im allgemeinen zwischen 50 und 150°C, vorzugsweise zwischen 55 und 100°C. Die Polymeri-  
15 sation dauert 0.5 bis einige Stunden. Es hat sich bewährt, ein Temperaturprogramm anzuwenden, bei dem die Polymerisation bei niedriger Temperatur, beispielsweise 70°C begonnen wird und mit fortschreitendem Polymerisationsumsatz die Reaktionstemperatur erhöht wird.

20 Nach der Polymerisation kann das Polymerisat mit üblichen Methoden, beispielsweise durch Filtrieren oder Dekantieren, isoliert und gegebenenfalls nach ein oder mehreren Wäschen getrocknet werden. Das Porogen kann während der Trocknung entfernt werden. Bei niedrig siedenden Porogenen, wie beispielsweise Hexan ist es  
25 auch möglich, das Porogen aus dem wäßrigen Reaktionsgemisch vor dem Isolieren des Perlpolymerisates ganz oder teilweise durch Destillation abzutrennen.

Die Herstellung der in Wasser quellbaren Perlpolymerisate erfolgt analog der Herstellung der makroporösen Perlpolymerisate, wobei anstelle der hydrophoben Vinyl-  
30 monomere (c1) hydrophile Vinylmonomere (c2) und anstelle des Porogens ein Lösungsmittel eingesetzt wird.



Geeignete Lösungsmittel sind solche, die mit Wasser nicht mischbar sind, die Monomeren und den Vernetzer lösen und das gebildete Polymerisat nicht ausfällen sondern lösen bzw. quellen. Geeignete Lösemittel sind Toluol, Xylol, Tetrachlor-  
5 methan, Chloroform, Methylenchlorid, Dichlorethan und Ethylacetat. Die Menge an Hilfslösemittel beträgt im allgemeinen 10 bis 200 Gew.-%, vorzugsweise 10 bis 150 Gew.-%, besonders bevorzugt 20 bis 100 Gew.-% bezogen auf die Summe aus Monomeren und Vernetzer. Sofern gewünscht kann das Hilfslösemittel nach der Polymerisation beispielsweise durch Destillation abgetrennt werden. Toluol läßt sich  
10 besonders einfach durch azeotrope Destillation entfernen.

Die erfindungsgemäßen in Wasser quellbaren Perlpolymerisate haben Quellungs-indices von 1,2 bis 12, vorzugsweise 1,5 bis 8 gemessen bei 25°C und pH 7. Als Quellungsindex ist der Quotient aus dem Volumen des bis zur Sättigung in Wasser  
15 gequollenen Perlpolymerisates und dem Volumen des wasserfreien Perlpolymerisates definiert.

Weiterhin Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind Mittel zur Isolierung von Nucleinsäuren enthaltend wasserunlösliche makroporöse Perlpolymerisate mit einer  
20 mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm, einen Porendurchmesser von 10 bis 1 000 nm und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis 500 m<sup>2</sup>/g, bestehend aus polymerisierten Einheiten von

- a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer
- 25 b) 2 bis 30 Gew.-% Vernetzer
- c1) 0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

oder von in Wasser unlöslichen aber quellbaren Perlpolymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm, bestehend aus polymerisierten Einheiten von

- a) 5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer
- b) 0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und
- c2) 10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer.

5     Diese Mittel liegen vorzugsweise als wässrige Dispersionen mit einem Feststoffgehalt von 0,1 - 50 %, besonders bevorzugt 1 - 10 % vor. Die wässrige Phase kann gegebenenfalls Puffer enthalten, die vorzugsweise im Bereich von 2 - 6 wirksam sind.

10    Mögliche Einsatzgebiete eines beispielsweise als Testkit formulierten Mittels sind die oben bereits genannten Anwendungsbeispiele, beispielsweise bei der Isolierung von Nucleinsäuren aus Zellen, Gewebematerialien, Blut oder Infektionserregern, wobei besonders alle Fragen der Diagnostik eine Rolle spielen. Als Testkit werden auch die beschriebenen Polymerisate für Routine-Nucleinsäuretests in Mikrotiterplatten und/oder Teströhrchen verstanden oder anderen Formaten wie z.B. im Rahmen der

15    Chiptechnologie.

## Beispiele

### Beispiel 1

#### 5 Herstellung des Aminomonomers der Formel 1

Zu einer gerührten Lösung aus 50,07 g (0,4 Mol) 3-Aminopropylimidazol, 140 mg 2,6-Di-tert.butyl-4-methylphenol (Stabilisator), 140 mg Dibutylzinndilaurat (Katalysator) in 250 ml Chloroform wurden bei 20°C unter Kühlung 62,08 g (0,4 Mol) 2-  
10 Isocyanatoethylmethacrylat innerhalb von 60 Min zugetropft. Anschließend wurde der Ansatz solange auf 50°C erhitzt (ca. 5 h) bis im IR-Spektrum keine NCO-Bande nachweisbar war. Man erhielt 112g Aminomonomer der Formel (I).

### Beispiel 2

15

#### Herstellung eines gelförmigen Perlpolymerisates

In einem 250ml-Reaktionsgefäß mit Blattrührer, Rückflußkühler, Thermometer, Gaseinlaß- und Gasauslaßrohr wurde eine Lösung aus 5g Polyvinylalkohol  
20 (Mowiol® 40-88) und 1,5 g Dinatriumhydrogenphosphat in 130 ml entionisiertem Wasser vorgelegt. Zu dieser wäßrigen Lösung wurde bei 20°C unter Rühren mit 450 Upm eine organische Lösung aus 7,91 g N,N-Dimethylamino-ethylmethacrylat, 7g 2-Hydroxyethyl-methacrylat, 0,17g Triethylglycoldimethacrylat, 0,225 g 2,2'-Azobis(2,4-dimethylvalereonitril) und 37,5 g Chloroform innerhalb von 15 min  
25 zugegeben. Es wurde leicht mit Stickstoff gespült und die Temperatur auf 67°C erhöht und 20 Stunden bei dieser Temperatur belassen. Nach dem Abkühlen wurde das gebildete Perlpolymerisat durch Dekantieren von der Reaktionsflotte abgetrennt und im Vakuum bei 50°C von Chloroform befreit. Man erhielt 13,5 g Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 20 µm und einem Quellungsindex von 5,1  
30 gemessen bei 25 °C in Wasser.

**Beispiel 3****Herstellung eines makroporösen Perlpolymerisates**

5 In einem 2 Liter-Reaktionsgefäß mit Blattrührer, Rückflußkühler, Thermometer, Gaseinlaß- und Gasauslaßrohr wurde eine Lösung aus 42,5g Polyvinylalkohol (Moviol 40-88) und 12,75 g Dinatriumhydrogenphosphat in 1240 g entionisiertem Wasser vorgelegt. Zu dieser wäßrigen Lösung wurde bei 20°C unter Rühren mit 280 Upm (Umdrehungen pro Minute) eine organische Lösung aus 23,71 g N,N-  
10 Dimethylaminoethylmethacrylat, 13,04 g Styrol, 10,67 g Divinylbenzol, 0,71g 2,2'-Azobis(2,4-dimethylvalereonitril) und 31,62 g Hexan innerhalb von 30 min bei 25 °C zugegeben. Es wurde leicht mit Stickstoff gespült und die Temperatur auf 66°C erhöht und 20 Stunden bei dieser Temperatur belassen. Danach wurde bei einer Innentemperatur von 70 bis 98 °C das Hexan abdestilliert. Nach dem Abkühlen  
15 wurde das entstandene Perlpolymerisat durch Dekantieren von der Reaktionsflotte abgetrennt und im Vakuum bei 50°C getrocknet. Man erhielt 38 g Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 15 µm und einer spezifischen Oberfläche von 62,3 m<sup>2</sup>/g.

**Beispiel 4****Herstellung eines makroporösen Perlpolymerisates**

Beispiel 3 wurde wiederholt, wobei eine organische Lösung aus 23,71 g Aminomonomer aus Beispiel 1, 13,04 g Styrol, 10,67 g Divinylbenzol, 0,71g 2,2'-Azobis(2,4-dimethylvalereonitril) und 38 g Hexan eingesetzt wurde. Man erhielt 35 g makroporöses Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 25 µm und einer spezifischen Oberfläche von 74 m<sup>2</sup>/g.

25

**Biologisches Ergebnis**

- 100 µl Blut wurden mit  $10^5$  Caski Zellen gemischt. Diese Zellen enthalten das humane Papillomvirus Typ 16 (HPV).
- 5 • Zu diesem Gemisch wurden 10 µl einer 2,4 %-igen Partikeldispersion aus Beispiel 2 hinzugegeben.
- Nach Zugabe von 200 µl eines geeigneten Puffers, beispielsweise TE, erfolgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur (TE steht für 10 mMol Tris HCl und 1 mMol Ethylendiamintetraessigsäure pH 7.4 in der Endkonzentration).
- 10 • Die Partikel wurden danach bei 7 000 rpm für 3 min in einer Eppendorffzentrifuge sedimentiert.
- Zum Sediment wurden nun 200 µl eines geeigneten Lysispuffers, beispielsweise 0,5 % IGEPAL CA-630® in TE (IGEPAL CA-630® ist ein nicht-ionisches Detergens, was beispielsweise durch die Firma Sigma, Bestellnummer I 3021 bezogen werden kann), gegeben und erneut für 5 min bei
- 15 Raumtemperatur inkubiert.  
Statt IGEPAL CA-630® können aber auch andere Lysispuffer eingesetzt werden. Beispielfhaft seien hier klassische Verfahren wie mit Protease K Verdau und anschließende Reinigung mittels Phenol/Chloroform oder
- 20 Natriumlaurylsulfat-Lösungen genannt (Sigma Bestellnummer: L 6026), beispielsweise als 0,5 %ige wässrige Lösung.
- Es erfolgte die erneute Zentrifugation und Sedimentation bei 7 000 rpm für 3 min in einer Eppendorffzentrifuge.
- 25 • Die Partikel wurden anschließend 2 x mit einem geeigneten Puffer (z.B. TE) gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde der Überstand verworfen und nur noch mit den Partikeln weitergearbeitet.
- Die Freisetzung der an die Partikel gebundenen Nukleinsäure erfolgte durch Einstellung des pH-Wertes auf >12 durch Zugabe von 1 µl 0,5 normaler
- 30 NaOH.
- Es schloß sich eine 15minütige Inkubation bei Raumtemperatur an.

- Nach Zentrifugation (3 min, 7 000 rpm in einer Eppendorffzentrifuge) wurde die Konzentration der gewonnenen Nukleinsäure mittels eines geeigneten Verfahrens, beispielsweise durch Analyse in einem Gelsystem, besonders bevorzugt das "Submerged Gel Nucleic Acid Electrophoresis System", Best.-Nr. 170 4406 der Firma BIO-RAD (webpage: [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)), bestimmt.  
Im Vergleich zu Beads für die Nucleinsäureextraktion, wie sie aus dem Verfahren der EP-A-0 707 077 bekannt waren, wurden mit den erfindungsge-  
mäßigen Verfahren und den darin verwendeten Perlpolymerisaten überraschend  
deutlich bessere Resultate erzielt.
- 15 µl des so gewonnenen Überstandes wurden nun in eine HPV spezifische  
PCR (Polymerasekettenreaktion) eingesetzt, das heißt, dass Primer in eine  
PCR eingesetzt wurde, die spezifisch für humane Papillomviren (HPV) sind.  
Bei der Analyse des Ergebnisses auf einem Gelsystem konnte die erwartete  
Nukleinsäurebande klar und deutlich identifiziert werden.

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe umfassend die nachfolgenden Schritte
- 5
- A) Vermischen der Probe mit einem wasserunlöslichen, im basischen und neutralen Bereich nicht ionischen Polymerisat bei einem pH-Wert von 7 oder weniger, wobei die Nucleinsäuren adsorbiert werden,
- 10
- B) Abtrennen des wasserunlöslichen Polymerisates,
- C) Vermischen des wasserunlöslichen Polymerisates mit einer wäßrigen Phase mit einem pH-Wert von größer 7, wobei die adsorbierten Nucleinsäuren freigesetzt werden,
- 15
- dadurch gekennzeichnet, daß das wasserunlösliche Polymerisat ein Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm ist und aus polymerisierten Einheiten von
- 20
- a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer  
b) 0,3 bis 30 Gew.-% Vernetzer und  
c) 0 bis 93 Gew.-% Vinylmonomer
- besteht.
- 25
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß nach Verfahrensschritt A) die Lyse des biologischen Materials erfolgt.
3. Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren umfassend die Schritte A), B) und C) gemäß der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Polymerisat ein wasserlösliches, makroporöses Perlpolymerisat mit einer mittleren
- 30

Teilchengröße von 3 bis 100  $\mu\text{m}$  und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis 500  $\text{m}^2/\text{g}$  ist und aus polymerisierten Einheiten von

- 5
- a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer
  - b) 0,3 bis 30 Gew.-% Vernetzer und
  - c1) 0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

besteht, oder daß das wasserunlösliche Polymerisat aus

- 10
- in Wasser gut quellbarem Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100  $\mu\text{m}$ , das aus polymerisierten Einheiten von

- 15
- a) 5 bis 79,5 Gew.-% Aminomonomer
  - b) 0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und
  - c2) 10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer

besteht.

- 20
4. Wasserunlösliche, makroporöse Perlpolymerisate mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100  $\mu\text{m}$ , einem Porendurchmesser von 10 bis 1 000 nm und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis 500  $\text{m}^2/\text{g}$ , dadurch gekennzeichnet, daß diese aus polymerisierten Einheiten von

- 25
- a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer
  - b) 2 bis 30 Gew.-% Vernetzer und
  - c1) 0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

bestehen.

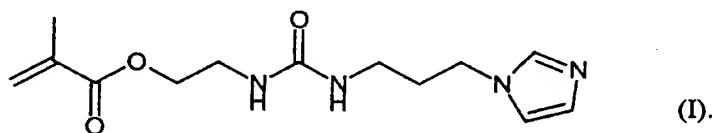


5. Wasserunlösliche aber in Wasser quellbare Perlpolymerisate mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100  $\mu\text{m}$ , dadurch gekennzeichnet, daß diese aus polymerisierten Einheiten von
- 5 a) 5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer  
b) 0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und  
c2) 10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer
- bestehen.
- 10 6. Verfahren zur Herstellung von wasserunlöslichen, makroporösen Perlpolymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100  $\mu\text{m}$ , einem Porendurchmesser von 10 bis 1 000 nm und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis 500  $\text{m}^2/\text{g}$ , dadurch gekennzeichnet, daß man eine
- 15 Mischung von
- a) 5 bis 98 Gew-Teilen Aminomonomer  
b) 2 bis 30 Gew-Teilen Vernetzer  
c1) 0 bis 93 Gew-Teilen hydrophobem Vinylmonomer  
20 d) 10-150 Gew-Teilen Porogen und  
e) 0,1 - 2,5 Gew-Teilen Radikalbildner
- in einem wäßrigen Medium unter Verwendung eines Schutzkolloides dispergiert, anschließend die erhaltene Dispersion durch Erhitzen auf die Zerfallstemperatur des Radikalbildners polymerisiert und nach erfolgter Polymerisation das Porogen durch Extraktion und/oder Abdampfen entfernt.
- 25
7. Verfahren zur Herstellung von in Wasser unlöslichen aber quellbaren Perlpolymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100  $\mu\text{m}$ , dadurch gekennzeichnet, daß man eine Mischung von
- 30

- 5
- a) 5 bis 79,7 Gew% Aminomonomer
  - b) 0,3 bis 10 Gew% Vernetzer und
  - c2) 10 bis 93 Gew% hydrophilem Vinylmonomer
  - d) 10-150 Gew-Teilen Lösungsmittel und
  - e) 0,1 - 2,5 Gew-Teilen Radikalbildner

10 in einem wäßrigen Medium unter Verwendung eines Schutzkolloides dispergiert, anschließend die erhaltene Dispersion durch Erhitzen auf die Zerfallstemperatur des Radikalbildners polymerisiert und nach erfolgter Polymerisation das Lösungsmittel durch Extraktion und/oder Abdampfen entfernt.

8. Aminomonomer gemäß Formel (I)



15

9. Verfahren zur Herstellung von Aminomonomer der Formel (I) gemäß Anspruch 8 dadurch gekennzeichnet, daß man 2-Isocyanatoethylmethacrylat mit 3-Aminopropylimidazol umsetzt.
- 20 10. Verwendung von wasserunlöslichen, makroporösen Perlpolymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100 µm, einem Porendurchmesser von 10 bis 1 000 nm und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis 500 m<sup>2</sup>/g, bestehend aus polymerisierten Einheiten von
- 25
- a) 5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer
  - b) 2 bis 30 Gew.-% Vernetzer
  - c1) 0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

oder von in Wasser unlöslichen aber quellbaren Perlpolymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100  $\mu\text{m}$ , bestehend aus polymerisierten Einheiten von

- 5           a)     5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer  
          b)     0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und  
          c2)    10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer

zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe.

10

11.   Mittel zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe enthaltend wasser-unlösliche makroporöse Perlpolymerisate mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100  $\mu\text{m}$ , einem Porendurchmesser von 10 bis 1 000 nm und einer spezifischen Oberfläche gemessen nach BET von 5 bis 500  $\text{m}^2/\text{g}$ , bestehend aus polymerisierten Einheiten von

15

- a)     5 bis 98 Gew.-% Aminomonomer  
          b)     2 bis 30 Gew.-% Vernetzer  
          c1)    0 bis 93 Gew.-% hydrophobem Vinylmonomer

20

oder von in Wasser unlöslichen aber quellbaren Perlpolymerisaten mit einer mittleren Teilchengröße von 3 bis 100  $\mu\text{m}$ , bestehend aus polymerisierten Einheiten von

- 25           a)     5 bis 79,7 Gew.-% Aminomonomer  
          b)     0,3 bis 10 Gew.-% Vernetzer und  
          c2)    10 bis 93 Gew.-% hydrophilem Vinylmonomer.

WPAT

Selected file: WPAT

Welcome to Derwent World Patent Index, (c) Derwent Information Ltd  
UP (basic) , UE (equiv) , UA (poly) , UB (chem) updates thru 2002-21  
US Patent Applications are in 11 digit format: USYYYYNNNNNN/pn  
**Last database update : 2002/04/03 (YYYY/MM/DD)**

1 - fam de19907023/pn - 1

1 Patent Groups  
\*\* SS 1: Results 1

Doc. on ss 1 using fu  
1/1 WPAT DE19907023 Isolation of nucleic acids, useful for e.g. genetic diagnosis by  
amplification, by adsorption onto poly[...]

Title

Isolation of nucleic acids, useful for e.g. genetic diagnosis by amplification, by adsorption onto  
polymeric beads at neutral or acidic pH then release at basic pH

Patent Data

Patent Family

DE19907023 A1 20000824 DW2000-54 C12Q-001/68 8p \* AP: 1999DE-1007023 19990219  
WO200049031 A2 20000824 DW2000-54 C07H-021/00 Ger AP: 2000WO-EP01028 20000209 DSNW: AE AL AM AT  
AU A2 BA BB BG BR BY CA CH CN CR CU CZ DE DK DM EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG  
KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT  
TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW DSRW: AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW NL  
OA PT SD SE SL SZ TZ UG ZW  
AU200025471 A 20000904 DW2001-03 C07H-021/00 FD: Based on WO200049031 AP: 2000AU-0025471  
20000209  
EP1155026 A2 20011121 DW2001-76 C07H-021/00 Ger FD: Based on WO200049031 AP: 2000EP-0903676  
20000209; 2000WO-EP01028 20000209 DSR: AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC MK  
NL PT RO SE SI

Priority n°: 1999DE-1007023 19990219

Covered countries: 91

Publications count: 4

Abstract

Basic Abstract

DE19907023 A NOVELTY - A method for isolation of nucleic acids, comprising adsorption onto  
polymeric beads at neutral or acidic pH then release at basic pH, is new.

DETAILED DESCRIPTION - Method for isolating nucleic acid (NA) comprises:

(i) mixing a sample at pH 7 or below with a polymer (A) that is insoluble in water and nonionic at  
basic and neutral pH to adsorb NA;

(ii) separating (A) and

(iii) treating (A) with an aqueous phase at pH over 7 to release NA.

(A) consists of beads of particle size 3-100 micron prepared from 5-98% amino-monomer (AM), 0.3-90%  
crosslinker (CL) and 0-93% vinyl monomer (VM), by weight.

INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

(1) macroporous polymer beads (A') of particle size 3-100 micron, pore size 10-1000 nm and specific  
surface area (measured by the BET method) 5-500 square m/g and prepared from 5-98% AM, 2-30% CL and  
0-93% hydrophobic VM;

(2) water-insoluble but water-swellaable polymer beads (A'') of particle size 3-100 micron and  
prepared from 5-79.7% AM, 0.3-10% CL and 10-93% hydrophilic VM;

(3) a method for preparing (A') and (A'');

(4) the amino-monomer of formula (I);

(5) a method for preparing (I); and

(6) an agent for isolation of NA comprising (A') or (A'').

USE - The method is used to isolate NA for subsequent use in genetic diagnosis, e.g. in human  
medicine for identifying infectious agents, genomic mutations of risk factors that predispose to  
disease, or to detect circulating tumor cells, also in veterinary medicine, environmental analysis  
and in foods.

ADVANTAGE - The polymers (A) have higher adsorption and release rates than known soluble polymers  
of EP 707077 and NA can be separated more quickly and in fewer stages. Also the product is purer,  
specifically it has lower contents of inhibitory compounds, making is particularly suitable for  
amplification reactions and restriction enzyme digestion. (Dwg.0/0)

Patentee, Inventor

Patent assignee: (FARB ) BAYER AG

Inventor(s): NEUMANN R; PODSZUN W

IPC: C07H-021/00 C12Q-001/68 C07D-233/48 C08F-020/36 C08F-220/36 C08J-009/20

Accession Codes

Number: 2000-573200 [54]

Sec. No.: C2000-171036

Codes

Manual Codes

CPI: A04-D01 A12-V03C2 A12-W11L B04-B03C B04-C03 B04-E01 B07-D09 B11-C08D B11-C08E B11-C09  
B12-K04A1 B12-K04E C04-B03C C04-C03 C04-E01 C07-D09 C11-C08D C11-C08E C11-C09 C12-K04A1 C12-K04E  
D05-C07 D05-H10 D05-H12 D05-H13 D05-H18 D05-H19 E04-B E07-D09B E11-Q01 E11-Q03 J04-B01

Derwent Classes: A14 A89 B04 C06 D16 E13 J04

Updates Codes

Basic update code: 2000-54

Equiv. update code: 2000-54; 2001-03; 2001-76

Others...

CPIM: Derwent 2002

UE4: 2001-12

st en